

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

AN

特開平8-217798

(43) 公開日 平成8年(1996)8月27日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C07K 16/24		8517-4H	C07K 16/24	
1/22		8517-4H	1/22	
C12N 5/10			C12P 21/08	
15/02			G01N 33/53	D
C12P 21/08				N
審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全13頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-45057

(22) 出願日 平成7年(1995)2月10日

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 國方 敏夫

岡山県岡山市神田町2丁目8番49号

(72) 発明者 谷口 睦子

岡山県岡山市平井5丁目3番30-5号

(72) 発明者 河野 恵三

岡山県赤磐郡瀬戸町沖155番地の6

(72) 発明者 栗本 雅司

岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体

(57) 【要約】

【目的】 免疫担当細胞において I F N - γ の産生を誘導する蛋白質に特異的なモノクローナル抗体及びそのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ並びにそれらの用途を提供する。

【構成】 特定の理化学的性質を有する蛋白質に特異的なモノクローナル抗体と、そのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマと、そのハイブリドーマを生体外又は生体内で培養する工程とその培養物又は体液からモノクローナル抗体を採取する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法と、モノクローナル抗体を蛋白質と夾雑物質を含む混合物に接触させてモノクローナル抗体に蛋白質を吸着させる工程と、吸着した蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなる蛋白質の精製方法と、被検試料にモノクローナル抗体を接触せしめ、免疫反応により蛋白質を検出する蛋白質の検出方法を要旨とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有する蛋白質に特異的なモノクローナル抗体。

(1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19,000±5,000ダルトンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4.8±1.0に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導する。

【請求項2】 蛋白質が配列表における配列番号3（ただし、「Xaa」はメチオニン又はトレオニンを意味するものとする。）に示すアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列を有する請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 蛋白質がマウスに由来する請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 IgG又はIgMのクラスに属する請求項1、2又は3に記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 モノクローナル抗体がモノクローナル抗体M-1mAbである請求項1、2、3又は4に記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 請求項1乃至5に記載のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ。

【請求項7】 ハイブリドーマがハイブリドーマM-1である請求項6に記載のハイブリドーマ。

【請求項8】 請求項1乃至5に記載のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを生体外又は生体内で培養する工程とその培養物又は体液からモノクローナル抗体を採取する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項9】 培養物又は体液からモノクローナル抗体を塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項8に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項10】 ハイブリドーマがハイブリドーマM-1である請求項8又は9に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項11】 請求項1乃至5に記載のモノクローナル抗体を下記の理化学的性質を有する蛋白質と夾雑物質を含む混合物に接触させてモノクローナル抗体に蛋白質

を吸着させる工程と、吸着した蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなる蛋白質の精製方法。

(1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19,000±5,000ダルトンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4.8±1.0に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導する。

【請求項12】 モノクローナル抗体が水不溶性担体に結合している請求項11に記載の蛋白質の精製方法。

【請求項13】 蛋白質が配列表における配列番号3（ただし、「Xaa」はメチオニン又はトレオニンを意味するものとする。）に示すアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列を有する請求項11又は12に記載の蛋白質の精製方法。

【請求項14】 被検試料に請求項1乃至5に記載のモノクローナル抗体を接触せしめ、免疫反応により下記の理化学的性質を有する蛋白質を検出する蛋白質の検出方法。

(1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19,000±5,000ダルトンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4.8±1.0に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導する。

【請求項15】 モノクローナル抗体が放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識されている請求項14に記載の蛋白質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は新規なモノクローナル抗体に関するものであり、詳細には、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ （以下、「IFN- γ 」と略記する。）の産生を誘導する蛋白質に特異的なモノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】IFN- γ は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトジェンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用ゆえに、IFN- γ はその発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が鶴首され、現在では脳腫瘍を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN- γ は免疫担当細胞が産生する天然型IFN- γ と、免疫担当細胞から採取したIFN- γ をコード

するDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型IFN- γ に大別され、上記臨床試験においては、これらのうちのいずれかが「外来IFN- γ 」として投与されている。

【0003】このうち、天然型IFN- γ は、通常、培養株化した免疫担当細胞をIFN- γ 誘導剤を含む培養培地で培養し、その培養物を精製することにより製造される。この方法では、IFN- γ 誘導剤の種類がIFN- γ の産生量や精製のし易さ、さらには、製品の安全性等に多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コンカナバリンA、レンズ豆レクチン、アメリカヤマゴボウレクチン、エンドトキシン、リポ多糖などのマイトジェンが頻用される。しかしながら、これら物質は、いずれも分子に多様性があり、給源や精製方法に依って品質が変動し易く、誘導能の一定したIFN- γ 誘導剤を所望量入手し難いという問題がある。くわえて、上記物質の多くは生体に投与すると顕著な副作用を示したり、物質に依っては毒性を示すものすらあり、生体に直接投与してIFN- γ の産生を誘導するのが極めて困難であつた。

【0004】本発明者らが、哺乳類の細胞が産生するサイトカイン類につき研究していたところ、マウスの肝臓中にIFN- γ の産生を誘導する従来未知の全く新規な物質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの物質を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質は蛋白質であり、次のような理化学的性質を有していることが判明した。

(1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19,000 \pm 5,000ダルトンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4.8 \pm 1.0に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する。

【0005】斯かる理化学的性質を有する蛋白質は未だ

知られておらず、新規物質であると判断される。そこで、本発明者らが、引続き、マウス肝細胞を鋭意検索したところ、この蛋白質をコードするDNAを単離するのに成功した。解読したところ、このDNAは471塩基対からなり、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列をコードしていることが判明した。その後、このDNAを大腸菌に導入し、発現させたところ、培養物中に当該蛋白質が好収量で産生した。以上の知見は、同じ特許出願人による特願平6-184162号明細書に開示されている。

【0006】前述のとおり、当該蛋白質は免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を具備しており、汎用IFN- γ 誘導剤、さらには、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、抗菌剤、免疫調節剤、血小板増多剤などとして多種多様な用途が期待される。一般に、生理活性蛋白質を医薬品に配合使用しようとする、その蛋白質を高度且つ効率的に精製し得る方法や、数多くの被検試料を一度にアッセイする方法の開発が不可欠となる。斯かる精製及びアッセイを可能ならしめる最良の材料はモノクローナル抗体であるが、当該蛋白質に特異的なモノクローナル抗体は未だ樹立されていない。

【0007】

【発明により解決すべき課題】斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、前述のごとき理化学的性質を有する蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を提供することにある。

【0008】この発明の別の目的は、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを提供することにある。

【0009】この発明のさらに別の目的は、斯かるモノクローナル抗体の製造方法を提供することにある。

【0010】この発明のさらに別の目的は、斯かるモノクローナル抗体による当該蛋白質の精製方法を提供することにある。

【0011】この発明のさらに別の目的は、斯かるモノクローナル抗体による当該蛋白質の検出方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記第一の課題を、下記の理化学的性質を有する蛋白質に特異的なモノクローナル抗体により解決するものである。

(1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19,000 \pm 5,000ダルトンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4.8 \pm 1.0に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配

列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導する。

【0013】この発明は、前記第二の課題を、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマにより解決するものである。

【0014】この発明は、前記第三の課題を、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを生体外又は生体内で培養する工程とその培養物又は体液からモノクローナル抗体を採取する工程を含んでなるモノクローナル抗体の製造方法により解決するものである。

【0015】この発明は、前記第四の課題を、斯かるモノクローナル抗体を当該蛋白質と夾雑物質を含む混合物に接触させてモノクローナル抗体に蛋白質を吸着させる工程と、吸着した蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなる蛋白質の精製方法により解決するものである。

【0016】この発明は、前記第五の課題を、被検試料に斯かるモノクローナル抗体を接触せしめ、免疫反応により当該蛋白質を検出する蛋白質の検出方法により解決するものである。

【0017】

【作用】この発明のモノクローナル抗体は、特定の理化学的性質を有する蛋白質と特異的に反応する。

【0018】この発明のハイブリドーマは、生体外で培養すると、斯かるモノクローナル抗体を産生する。

【0019】この発明による製造方法によるときは、斯かるモノクローナル抗体の所望量が容易に得られる。

【0020】この発明による精製方法によるときは、当該蛋白質と夾雑物質を含む混合物から、当該蛋白質が高純度且つ効率的に採取される。

【0021】この発明による検出方法によるときは、被検試料中の当該蛋白質のみが免疫反応を呈するので、適宜手法によりその免疫反応を測定することにより、被検試料中の当該蛋白質を定性的又は定量的に検出することができる。

【0022】この発明でいうモノクローナル抗体とは、前述の理化学的性質を有する蛋白質に特異的なモノクローナル抗体全般を包含するものとし、その出所・由来、クラスは問わない。対象となる個々の蛋白質としては、例えば、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列を有する蛋白質が挙げられる。配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列とは、前述の理化学的性質を実質的に変えることなく、その配列番号3のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換したもの、配列番号3のアミノ酸配列におけるN末端及び／又はC末端にアミノ酸が1又は2個以上付加したもの及びそのN末端及び／C末端のアミノ酸が1個又

は2個以上欠失したものを包含する。

【0023】この発明のモノクローナル抗体は、斯かる蛋白質又はその抗原性フラグメントを抗原として用いることにより得ることができる。具体的には、例えば、斯かる抗原で免疫感作しておいた哺乳動物より採取した抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞とのハイブリドーマを作製し、これよりこの発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローンを選択し、これを生体内外で培養することにより得ることができる。

【0024】抗原となり得る蛋白質は、例えば、特願平6-184162号明細書に開示したように、マウス肝細胞から採取するか、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列をコードするDNAを導入した形質転換体を培養することにより得ることができ、それらは、通常、完全精製又は部分精製した状態で使用される。抗原性フラグメントを得るには、これら完全精製品又は部分精製品を化学的又は酵素的に分解するか、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列に基づきペプチド合成すればよい。

【0025】免疫感作は慣用の方法によればよく、例えば、上記のごとき抗原を単独又は適宜アジュバントとともに哺乳動物の静脈、皮内、皮下又は腹腔内に注射接種し、一定期間飼育する。哺乳動物に特に限定はなく、所期の抗体産生細胞が得られるかぎり、種類、大きさ、雌雄は問わない。通常はラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類が用いられ、後記無限増殖可能な哺乳類由来の細胞との適合性も勘案しながら、最適のものが選択される。哺乳動物の種類や大きさにも依るが、抗原の接種量は、通常、総接種量を約5乃至500 μ g/匹とし、これを約1乃至2週間の間隔を置いて2乃至5回に分けて接種する。そして、最終接種から3乃至5日後に脾臓を摘出し、分散して抗体産生細胞としての脾細胞を得る。

【0026】つぎに、斯くして得られた抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞とを融合させて、目的のハイブリドーマを含む細胞融合産物を得る。無限増殖可能な哺乳類由来の細胞には、通常、P3-NS1-Ag4-1細胞(ATCC TIB18)、P3-X63-Ag8細胞(ATCC TIB9)及びSP2/O-Ag14細胞(ATCC CRL1581)などのマウス骨髓種由来の細胞株又はその変異株が用いられる。細胞融合は、例えば、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスを始めとする融合促進剤や電気パルスによる慣用の方法が用いられ、一例を挙げると、融合促進剤を含む融合培地に抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞を約1:1乃至1:10の割合で浮遊させ、この状態のまま、約30乃至40℃で約1乃至5分間インキュベートする。融合培地には、例えば、MEM培地、RPMI1640培地及びイスコフ改変ダルベコ培地を始

めとする通常一般のものを用い得るが、ウシ血清などの血清類は除いておくのが望ましい。

【0027】目的のハイブリドーマを選択するには、まず、上記のようにして得た細胞融合産物をHAT培地などの選択用培地に移し、約30乃至40℃で約3日乃至3週間培養してハイブリドーマ以外の細胞を死滅させる。つぎに、ハイブリドーマを常法により培養し、培養物中に分泌された抗体につき、当該蛋白質との反応性を試験する。試験には、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ及びバイオアッセイなどの抗体を検出するための慣用の方法が用いられ、例えば、富山朔二・安東民衛編『単クローン抗体実験マニュアル』、1991年、講談社サイエンティフィック発行、第105乃至152頁にはそのための方法が種々詳述されている。当該蛋白質に特異的な抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法などにより、直ちにクローニングされ、単クローン化されたこの発明によるハイブリドーマを得る。

【0028】この発明のモノクローナル抗体は、斯かるハイブリドーマを生体内外で培養することにより得ることができる。培養には、哺乳類由来の細胞を培養するための慣用の方法が用いられ、例えば、生体外の培養培地で培養するときには、その培養物から、一方、ヒト以外の温血動物に移植し、生体内で培養するときには、その腹水及び／又は血液からモノクローナル抗体を採取する。後述のハイブリドーマM-1はモノクローナル抗体の産生能高く、しかも、生体内外における培養が容易であるという特徴がある。培養物又は腹水若しくは血液からモノクローナル抗体を採取するには、抗体一般を精製するための斯界における慣用の方法が用いられる。個々の方法としては、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動が挙げられ、これらは必要に応じて組合せて適用される。精製したモノクローナル抗体は、その後、濃縮・乾燥し、用途に応じて液状又は固状とする。

【0029】この発明のモノクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによる当該蛋白質の精製にきわめて有用である。斯かる精製方法は、この発明のモノクローナル抗体を当該蛋白質と当該蛋白質以外の夾雑蛋白質を始めとする夾雑物質との混合物に接触させてモノクローナル抗体に当該蛋白質のみを吸着させる工程と、吸着した蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなり、両工程は、通常、水性媒体中で行なわれる。この発明のモノクローナル抗体は、通常、ゲル状の水不溶性担体に結合した状態で用いられ、その水不溶性担体を円筒管などにカラム状に充填し、これに、例えば、マウス肝細胞の抽出液若しくは形質転換体の培養液又はそれらの部分精製品を通液すると、実質

的に当該蛋白質のみが水不溶性担体上のモノクローナル抗体に吸着する。吸着した蛋白質は、モノクローナル抗体周囲の水素イオン濃度を変えることにより、容易に脱着させることができ、例えば、IgGのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合は酸性側のpH、通常、pH2乃至3で、一方、IgMのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合はアルカリ側のpH、通常、pH10乃至11で溶出させる。

【0030】この発明の精製方法によるときは、当該蛋白質を最少限の労力と時間で高度に精製できる。前述のとおり、当該蛋白質は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を具備するので、得られた精製蛋白質は細胞培養法によりIFN- γ を製造の際の誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有する、例えば、エイズや尖圭コンジロムなどのウイルス性疾患、腎臓癌、肉芽腫、菌状息肉症、脳腫瘍などの悪性腫瘍、関節リウマチやアレルギー症などの免疫疾患に対する治療剤・予防剤として有用である。当該蛋白質がキラー細胞による細胞障害性を増強する性質を兼備する場合には、インターロイキン2や腫瘍壊死因子と適宜併用することにより、養子免疫療法による肺癌、腎臓癌、乳癌などの固形癌を含む悪性腫瘍の治療における治療効果や副作用の改善に著効が得られる。

【0031】この発明のモノクローナル抗体は、当該蛋白質の検出を必要とする諸分野にも広範な用途を有する。すなわち、この発明のモノクローナル抗体にラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイを適用するときには、被検試料中の当該蛋白質を迅速且つ正確に定性又は定量分析することができる。斯かる分析において、この発明のモノクローナル抗体は、例えば、放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識して用いられる。この発明のモノクローナル抗体は当該蛋白質に特異的に反応し、免疫反応を呈するので、その免疫反応をこれら標識物質を指標に測定すれば、被検試料中のごく微量の当該蛋白質を精度良く検出することができる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。したがって、この発明による検出方法は、当該蛋白質を製造する際の工程管理や製品の品質管理にきわめて有用である。なお、この発明はモノクローナル抗体の標識や標識アッセイそのものに係わるものではないので詳細な説明は省くが、例えば、ピー・ティッセン著、石川栄治訳『エンザイムイムノアッセイ』、1989年、東京化学同人発行、第196乃至348頁などにはそのための方法が種々詳述されている。

【0032】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、斯界の技術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる技術水準に鑑み、この発明

がこれら実施例のみに限定されるべきでないことは言うまでもない。

【0033】

【実施例1 ハイブリドーマM-1の調製】

【0034】

【実施例1-1 形質転換体KGFM5の作製】0.5 ml 容反応管に25mM塩化マグネシウムを8 μ l、10 \times PCR緩衝液を10 μ l、25mM dNTPミックスを1 μ l、2.5単位/ μ lアンブリタックDNAポリメラーゼを1 μ l、特願平6-184162号明細書に記載された方法にしたがってファージDNAクローンから調製した配列表における配列番号4に示す塩基配列を有し当該蛋白質をコードするのDNAを含む組換えDNAを1ng、配列表の配列番号3におけるN末端及びC末端付近のアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-GAGGAATTCTGGAGGAAGGTACCA TGAAC TTTGGCCGACTTC-3' 及び5'-GCGAAAGCTTCTAACTTTGATGTA AG-3' で表わされる塩基配列のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの適量を加え、滅菌蒸留水で100 μ lとした。常法により、この混合物を94℃で1分間、43℃で1分間、72℃で1分間、この順序でインキュベートするサイクルを3回繰返した後、さらに、94℃で1分間、60℃で1分間、70℃で1分間、この順序でインキュベーションするサイクルを37回繰返しPCR反応させ、配列番号4に示す塩基配列における5'末端及び3'末端にそれぞれEcoRI切断部位及びHindIII切断部位を設けた。

【0035】PCR産物、ストラタジーン製プラスミドベクター『pCR-Script SK (+)』10ngを常法により、DNAリガーゼで連結して組換えDNAとし、これをコンピテントセル法によりストラタジーン製大腸菌『XL-1 Blue MRF Kan』株に導入して形質転換した。形質転換体を50 μ g/mlアンピシリンを含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間振盪培養した後、培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNAを単離した。この組換えDNAの一部をとり、ジデオキシ法により分析したところ、配列表における配列番号4に示す塩基配列のDNAが連結されており、PCR反応において、所期のDNAが正しく遺伝子増幅されたことが確認された。

【0036】そこで、常法にしたがって残りの組換えDNAを制限酵素EcoRI及びHindIIIで切断後、宝酒造製DNAライゲーションキット『DNAライゲーション・キット・バージョン2』を使用して、得られたEcoRI-HindIII DNA断片0.1 μ gと予め同じ制限酵素で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』10ngを16℃で30分間反応させて連結して複製可能な

組換えDNA『pKGFM5』を得た。コンピテントセル法により、この組換えDNA pKGFM5で大腸菌Y1090株(ATCC37197)を形質転換し、得られた形質転換体『KGFM5』を50 μ g/mlアンピシリンを含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、その一部に通常のアルカリ法を適用して組換えDNA pKGFM5を抽出した。ジデオキシ法により分析したところ、図1に示すように、組換えDNA pKGFM5においては、配列表における配列番号4に示す塩基配列のKGFM5 cDNAがTacプロモータの下流に連結されていた。

【0037】

【実施例1-2 形質転換体KGFM5による蛋白質の産生】オートクレーブによりアンピシリン50 μ g/mlを含むL-ブロス培地(pH7.2)を滅菌し、37℃に冷却後、実施例1-1で作製した形質転換体KGFM5を接種し、振盪下、同じ温度で18時間種培養した。20l容ジャーファーマンタに新鮮な同一培地を18lとり、同様に滅菌し、37℃に冷却後、上記で得た種培養物を1%(v/v)接種し、同じ温度で8時間通気攪拌培養した。培養物を遠心分離して菌体を採取し、150mM塩化ナトリウム、16mM磷酸水素二ナトリウム及び4mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.3)に浮遊させ、超音波破碎後、遠心分離により菌体破碎物を除去し、上清を採取した。

【0038】この上清に氷冷下で硫酸アンモニウムを40%(w/v)まで加え、均一に溶解し、暫時静置し、遠心分離後、上清を採取した。この新たに生じた上清に硫酸アンモニウムを85%(w/v)まで加え、4℃で25時間攪拌し、遠心分離後、当該蛋白質を含む沈澱を採取した。この沈澱を1.5M硫酸アンモニウムを含む150mM磷酸緩衝液(pH6.6)に溶解し、溶液を予め1.5M硫酸アンモニウムを含む10mM磷酸緩衝液(pH6.6)により平衡化しておいたファルマシア製『フェニル・セファロース』のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1.5Mから0Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、10mM磷酸緩衝液(pH6.6)を通液した。

【0039】つぎに、硫酸アンモニウム濃度0.9M付近で溶出した画分をブールし、膜濃縮後、10mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4℃で18時間透析し、予め10mM磷酸緩衝液(pH6.5)により平衡化しておいた東ソー製『DEAE5PW』のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、10mM磷酸緩衝液(pH6.5)を通液し、塩化ナトリウム濃度0.1M付近で溶出した画分を採取した。

【0040】その後、この画分を膜濃縮し、予め磷酸食塩緩衝液(以下、「PBS」と云う。)により平衡化し

ておいたファルマシア製『スーパー・デックス75』のカラムに負荷し、新鮮なPBSを通液して溶出した分子量19,000ダルトン付近の画分を採取したところ、精製蛋白質を約4.7mg含む水溶液が得られた。全精製工程を通じての収率は約26%であった。

【0041】特願平6-184162号明細書に記載した方法に準じて分析したところ、精製蛋白質は次のような理化学的性質を有していた。すなわち、非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量19,000 \pm 5,000ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示す一方、クロマトフォーカシングすると、4.8 \pm 1.0に等電点を示した。また、トリプシン消化して得られる2種類のペプチド断片は、配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0042】

【実施例1-3 ハイブリドーマM-1の調製】10週齢SDラットの腹腔内に実施例1-2の方法により得た精製蛋白質を完全フロイントアジュバントともに20 μ g/匹の割合で注射接種した。その後、2週間おきに同一量を2回接種し、最後の接種から1週間後に同一量をさらに静脈注射し、3日後に脾臓を摘出し、分散して脾細胞を得た。

【0043】この脾細胞とマウス骨髓腫由来のSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)を37℃に予温しておいた血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)にそれぞれ細胞密度3 \times 10⁴個/ml及び1 \times 10⁴個/mlになるように浮遊させ、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱に平均分子量1,500ダルトンの50%(w/v)ポリエチレングリコールを含む血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)1mlを1分間かけて滴々加え、37℃で1分間インキュベートした後、全量が50mlになるまで血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)を滴々加え、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱をHAT培地に浮遊させ、96ウェルマイクロプレートに200 μ l/ウェルずつ分注し、37℃で1週間インキュベートしてハイブリドーマを選択した。

【0044】各ウェルにおける培養上清中に分泌された抗体につき、実施例1-2の方法により得た精製蛋白質との反応性をエンザイムイムノアッセイにより調べ、同精製蛋白質に反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。引続き、このハイブリドーマに常法にしたがって限界希釈を繰返し適用し、この発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローンM-1を得た。

【0045】

【実施例2 モノクローナル抗体M-1mAbの調製とウェスタンブロッティング分析】

【0046】

【実施例2-1 モノクローナル抗体M-1mAbの調製】実施例1-3の方法により得たハイブリドーマM-1を細胞密度約1 \times 10⁴個/mlになるように5%(v/v)ウシ血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に浮遊させ、培養規模を拡大しながら、5%CO₂インキュベータ中、37℃で培養した。所期の細胞密度に達した時点で、ハイブリドーマM-1を予めウサギ由来の抗ハムスター胸腺細胞抗体により免疫抑制するとともに、プリスタン0.5ml/匹腹腔内注射しておいた5週齢のハムスターの腹腔内に1 \times 10⁷個/匹注射接種し、通常の方法で1週間飼育した。

【0047】ハムスターから腹水を採取し、PBSで3倍希釈した後、硫酸アンモニウムを50%飽和になるように加え、4℃で2時間静置し、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱を20mM磷酸二水素カリウム水溶液(pH6.7)に対して4℃で一晩透析した後、予め新鮮な同一水溶液で平衡化しておいたヒドロキシアパタイトカラムに負荷し、濃度が20mMから300mMに直線的に上昇する磷酸二水素カリウム水溶液(pH6.7)を通液したところ、この発明のモノクローナル抗体M-1mAbを含む水溶液が得られた。収量は、ハムスター1匹当たり、約5mgであった。常法にしたがって分析したところ、このモノクローナル抗体M-1mAbはIgMのクラスに属していた。

【0048】

【実施例2-2 ウェスタンブロッティング分析】ジチオトレイトール100mg、10%(w/v)SDS水溶液0.5ml及びグリセロール1mlからなる混液に実施例1-2の方法により得た精製蛋白質を1 μ g加え、37℃で1時間インキュベートした後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。常法によりゲルをニトロセルロース膜に移し、ニトロセルロース膜をハイブリドーマM-1の培養上清に1時間浸漬した後、0.05%(v/v)ツイーン20を含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄して過剰の抗体を除いた。ニトロセルロース膜を西洋ワサビパーオキシダーゼで標識したウサギ由来の抗ラットIg抗体を含むPBSに1時間浸漬して反応させ、0.05%(v/v)ツイーン20を含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、0.005%(v/v)過酸化水素と0.3mg/mlジアミノベンジジンを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に浸漬して発色させた。

【0049】同時に、精製蛋白質に代えて、後記実施例4の方法により得たマウス肝細胞由来の精製蛋白質又は組換え型ヒトインターロイキン12を用いる系を設け、上記と同様に処置して対照とした。なお、分子量マーカには、ウシ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(45,000ダルトン)、カルボニックアンヒドラーゼ(30,000ダルトン)、トリプシ

ンインヒビター(20, 100ダルトン)及び α -ラクトアルブミン(14, 400ダルトン)を用いた。結果を図2に示す。

【0050】図2の結果に見られるように、モノクローナル抗体M-1mAbは、実施例1-2の方法により得た精製蛋白質(レーン1)及び実施例4の方法により得た精製蛋白質(レーン2)にのみ特異的に反応し、ヒトインターロイキン12(レーン3)には全く反応しなかった。このことは、この発明のモノクローナル抗体が、製造方法の如何に依らず、特定の理化学的性質を有する蛋白質に特異的に反応することを裏付けている。

【0051】【実施例3 イムノアフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質の精製】

【実施例3 イムノアフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質の精製】

【0052】

【実施例3-1 イムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲルの調製】実施例2-1の方法により得たモノクローナル抗体M-1mAbを80mgとり、0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M硼酸緩衝液(pH8.5)に対して4℃で一晩透析した。水不溶性担体としてファルマシア製『CNBr-活性化セファロース4B』4gを1mM塩酸水溶液中で膨潤させ、新鮮な同一塩酸水溶液、0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M硼酸緩衝液(pH8.5)の順序で洗浄した後、上記のモノクローナル抗体水溶液約10mlを加え、室温下で2時間、4℃でさらに一晩緩やかに攪拌した。その後、ゲルを1Mエタノールアミン水溶液(pH8.0)で洗浄し、さらに、0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M硼酸緩衝液(pH8.5)及び0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)をこの順序で用いて洗浄する工程を5回繰返し、最後にPBSで洗浄してイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲルを得た。常法により分析したところ、ゲル1ml当たり、約6mgのモノクローナル抗体M-1mAbが結合していた。

【0053】

【実施例3-2 イムノアフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質の精製】実施例3-1で得たイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲル10mlをプラスチック製円筒管内部にカラム状に充填し、PBSで洗浄後、実施例1-2の方法により得た当該蛋白質を約0.1mg/ml含むフェニルセファロース溶出画分10mlを負荷した。新鮮なPBSで洗浄した後、カラムに35mMエチルアミン水溶液(pH10.8)を通液し、IFN- γ 誘導能ある画分を採取した。採取した画分をブールし、濃縮後、IFN- γ 誘導活性及び蛋白質含量を測定したところ、純度95%以上の精製蛋白質が、原料当たり、ほぼ100%の収量で得られたことが判明した。

【0054】【実施例4 イムノアフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質の精製】

【実施例4 イムノアフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質の精製】8週齢の雌CD-1マウス600匹の腹腔内にコリネバクテリウム・パルバム(ATCC 11827)を60℃で1時間加熱して調製した死菌体を1mg/匹注射投与し、通常一般の方法で7日間飼育後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を1 μ g/匹注射投与した。1乃至2時間後、マウスを屠殺し、心臓採血後、肝臓を摘出し、8倍容の50mM磷酸緩衝液(pH7.3)中、ホモゲナイザーにより破碎して抽出した。抽出物を約8,000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清約9lに飽和硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液(pH7.3)を硫酸アンモニウムが45%飽和になるように加え、4℃で18時間静置後、約8,000rpmで30分間遠心分離して当該蛋白質を含む上清約19lを得た。

【0055】この上清を予め1M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液(pH7.3)で平衡化させておいたファルマシア製『フェニルセファロース』約4.6lのカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1Mから0.2Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、50mM磷酸緩衝液(pH7.3)をSV0.57で通液した。硫酸アンモニウム濃度が0.8M付近のときに溶出した当該蛋白質を含む画分約4.8lを採取し、膜濃縮し、20mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4℃で18時間透析後、予め20mM磷酸緩衝液(pH6.5)で平衡化させておいたファルマシア製『DEAE-セファロース』約250mlのカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに20mM磷酸緩衝液(pH6.5)をSV1.2で通液したところ、当該蛋白質が0.13M付近の塩化ナトリウム濃度で溶出した。

【0056】当該蛋白質を含む溶出液約260mlを採取し、濃縮後、実施例3と同様に精製したところ、純度95%以上の精製蛋白質が、原料当たり、ほぼ100%の収量で得られた。

【0057】

【実施例5 エンザイムイムノアッセイによる蛋白質の検出】常法にしたがって、実施例1-2の方法により得た精製蛋白質でウサギを免疫感作した後、血液を採取し、IgG抗体を単離した。このIgG抗体をPBSに20 μ g/mlになるように溶解し、96ウェルマイクロプレートに100 μ l/ウェルずつ分注した。マイクロプレートを室温下で3時間インキュベートした後、IgG溶液を除き、1%(w/v)ウシ血清アルブミンを含むPBSを200 μ l/ウェルずつ加え、4℃で一晩静置した。

【0058】マイクロプレートからPBSを除き、0.

0.5% (v/v) ツイーン20を含むPBSで洗浄後、実施例1-2の方法により得た精製蛋白質を0.5% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むPBSにより適宜濃度に希釈して100 μ l/ウェルずつ加え、振盪下、室温下で2時間反応させた。0.05% (v/v) ツイーン20を含むPBSで洗浄し、ビオチン標識したモノクローナル抗体M-1mAbを100 μ l/ウェルずつ加え、振盪しながら室温下で2時間反応させ、0.05% (v/v) ツイーン20を含むPBSで洗浄した後、西洋ワサビパーオキシダーゼとストレプトアビジンとの複合体を100 μ l/ウェルずつ加え、振盪しながら室温下でさらに2時間反応させた。0.05% (v/v) ツイーン20を含むPBSで洗浄後、精製蛋白質に結合した西洋ワサビパーオキシダーゼの活性を α -フェニレンジアミンを基質に波長492nmにおける吸光度として測定した。結果を表1に示す。

【0059】

【表1】

蛋白質濃度 (pg/ml)	吸光度 (A ₄₉₂) (トリプルバインド)	相対誤差 (%)
2,000	1.490 \pm 0.030	2.0
1,000	0.723 \pm 0.007	1.0
500	0.370 \pm 0.020	5.4
250	0.210 \pm 0.010	4.8
100	0.090 \pm 0.010	11.1
50	0.054 \pm 0.004	6.7
0	0.017 \pm 0.003	17.6

【0060】表1の結果から明らかなように、本検出方法によるときは、少なくとも約5.0乃至2,000pg/mlの当該蛋白質を精度良く検出し得る。

【0061】

【実施例6 ラジオイムノアッセイによる蛋白質の検出】常法にしたがって、実施例1-2の方法により得た精製蛋白質でウサギを免疫感作した後、血液を採取し、IgG抗体を単離した。このIgG抗体を常法によりラジオイムノアッセイ用ポリスチレンビーズに吸着させ、2% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むPBS中、4

【0062】試験管にこの固相抗体を1個ずつとり、実施例1-2の方法により得た精製蛋白質を0.5% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むPBSにより適宜濃度に希釈して0.2mlずつ加え、4℃で4時間静置し

配列

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln
1 5 10 15
Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys
20 25

た。固相抗体を0.05% (v/v) ツイーン20と0.5% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むPBSで洗浄した後、実施例2-1の方法により得たモノクローナル抗体M-1mAbを常法により¹²⁵I標識して0.2ml (1 \times 10⁵cpm) ずつ加え、4℃で一晩静置した。過剰の標識抗体を除去し、0.05% (v/v) ツイーン20と0.5% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むPBSで洗浄した後、ガンマカウンタによりビーズの放射能を測定した。結果を表2に示す。

【0063】

【表2】

蛋白質濃度 (pg/ml)	カウント数 (cpm) (トリプルバインド)	相対誤差 (%)
1,150	15,900 \pm 700	4.4
575	9,100 \pm 200	2.2
288	4,700 \pm 200	4.3
144	2,300 \pm 50	2.2
72	1,217 \pm 4	0.3
0	159 \pm 4	2.6

【0064】表2の結果から明らかなように、本検出方法によるときは、少なくとも約100乃至1,200pg/mlの当該蛋白質を精度良く検出できる。

【0065】

【発明の効果】以上説明したごとく、この発明のモノクローナル抗体は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質に特異的に反応する。したがって、この発明のモノクローナル抗体は、斯かる蛋白質の精製及び検出に多種多様の用途を有することとなる。斯くも有用なこの発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドマを用いる製造方法により、所望量を容易に得ることができる。

【0066】この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

【0067】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメントの種類:中間部フラグメント

17

18

【0068】配列番号:2

配列の長さ:18

配列の型:アミノ酸

配列

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro

1

5

10

15

Gln

【0069】配列番号:3

配列の長さ:157

配列の型:アミノ酸

配列

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn Asp

1

5

10

15

Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp

20

25

30

Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile Tyr Met Tyr

35

40

45

50

Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser

55

60

65

Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met

70

75

80

85

Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln

90

95

100

Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu

105

110

115

Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu

120

125

130

135

Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn

140

145

150

Leu His Gln Ser

155

【0070】配列番号:4

配列の長さ:471

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA

起源

生物名:マウス

組織名:肝臓

配列の特徴

配列を表わす記号:mat peptide

存在位置:1..471

特徴を決定した方法:S

配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT 48

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn

1

5

10

15

GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG 96

Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met

20

25

30

ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA 144

Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile

35

40

45

TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT 192

Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser

19 50 55 60 20
 GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT 240
 Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80
 TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT 288
 Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95
 GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG 336
 Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
 100 105 110
 TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA 384
 Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
 115 120 125
 GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT 432
 Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
 130 135 140
 AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT 471
 Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 145 150 155

【図面の簡単な説明】

【図1】組換えDNA pKGFM5の構造を示す図である。

【図2】この発明によるモノクローナル抗体M-1mAbと種々の蛋白質との反応性を示すウェスタンブロットング図である。

【符号の説明】

KGFM5 cDNA

蛋白質をコードするcD

20 NA

P t a c

r r n B T 1 T 2

ンの転写終止領域

A m p R

o r i

点

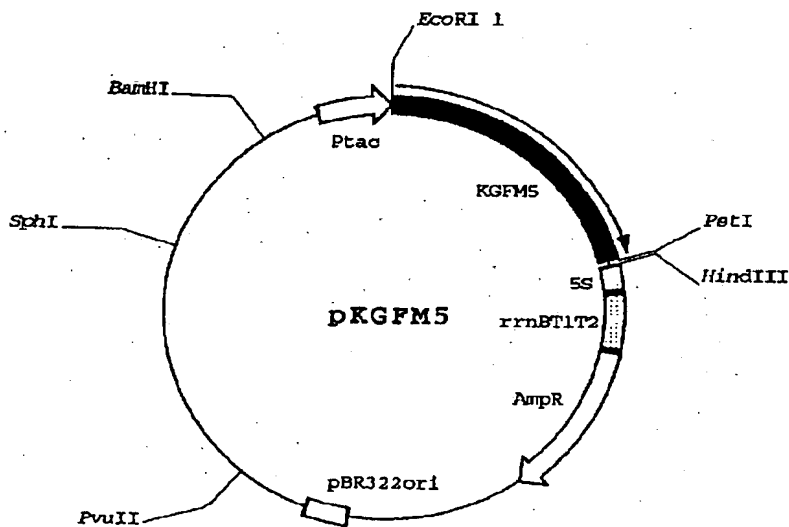
t a c プロモータ

リボゾームRNAオペロ

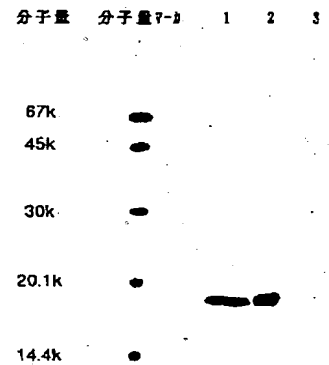
アンピシリン耐性遺伝子

大腸菌における複製開始

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成7年8月31日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】そこで、常法にしたがって残りの組換えDNAを制限酵素EcoRI及びHindIIIで切断後、宝酒造製DNAライゲーションキット『DNAライゲーション・キット・バージョン2』を使用して、得られたEcoRI-HindIII DNA断片0.1 μ gと予め同じ制限酵素で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』10ngを16℃で30分間反応させて連結させて複製可能な組換えDNA『pKGFM5』を得た。コンピテントセル法により、この組換えDNA pKGFM5で大腸菌Y1090株(ATCC37197)を形質転換し、得られた形質転換体『KGFM5』を50 μ g/mlアンピシリンを含むL-プロス培地(PH7.2)に接種し、37℃で18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、その一部に通常のSDS-アルカリ法を適用して組換えDNA pKGFM5を抽出した。ジデオキシ法により分析したところ、図1に示すように、組換えDNA pKGFM5においては、配列表における配列番号4に示す塩基配列のKGFM5 cDNAがTacプロモータの下流に連結されていた。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正内容】

【0037】

【実施例1-2 形質転換体KGFM5による蛋白質の産生】オートクレーブによりアンピシリン50 μ g/mlを含むL-プロス培地(pH7.2)を滅菌し、37℃に冷却後、実施例1-1で作製した形質転換体KGFM5を接種し、振盪下、同じ温度で18時間種培養した。201容ジャーファーマンタに新鮮な同一培地を18lとり、同様に滅菌し、37℃に冷却後、上記で得た種培養物を1% (v/v) 接種し、同じ温度で8時間通気攪拌培養した。培養物を遠心分離して菌体を採取し、150mM塩化ナトリウム、16mM磷酸水素二ナトリウム及び4mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.3)に浮遊させ、超音波破碎後、遠心分離により菌体破碎物を除去し、上清を採取した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】符号の説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【符号の説明】

KGFM5 cDNA	蛋白質をコードするcDNA
Ptac	tacプロモータ
rrnBT1T2	リボソームRNAオペロンの転写終止領域
AmpR	アンピシリン耐性遺伝子
pBR322ori	大腸菌における複製開始点

【手続補正4】

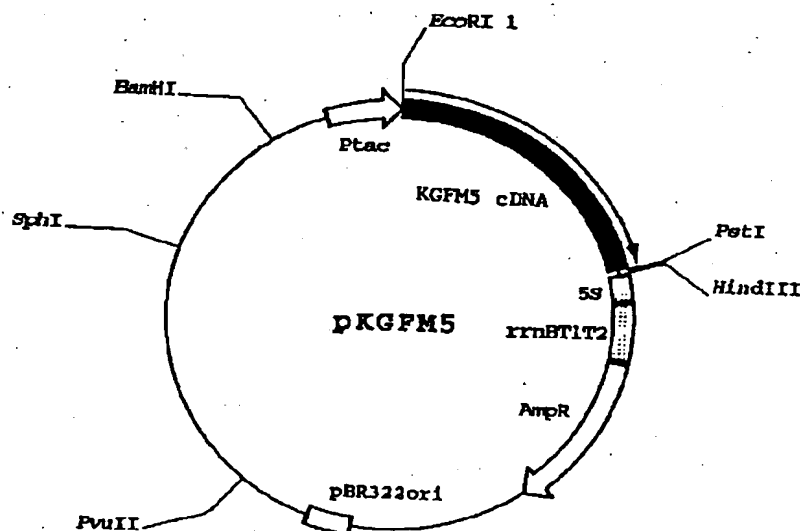
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. °	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G01N 33/53			A61K 39/395	U
				N
// A61K 38/21		9281-4B	C12N 5/00	B
39/395		9162-4B	15/00	C
			A61K 37/66	